

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04765

研究課題名(和文)ドーパミン機能の多様性を生む受容体発現様式

研究課題名(英文) Comprehensive expression profiling of dopamine receptors in a brain structure: a neuroanatomical logic towards understanding functional pleiotropy of dopamine

研究代表者

山方 恒宏 (Yamagata, Nobuhiro)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50716248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンは報酬、学習、意欲、運動調節など、多様な脳機能に関わる。細胞レベルにおけるドーパミンの神経修飾機能も多様であるが、その多様性を生む分子メカニズム、特に受容体機能への理解は十分ではない。本研究では、ショウジョウバエの記憶中枢をモデルとし、機能の異なるドーパミン受容体の発現解析を通じ、ドーパミン入力「異なる情報」として細胞に受容されるメカニズムを理解することを目的とした。ゲノム編集技術を駆使し、内在遺伝子の発現パターンと細胞内の分子局在を可視化、解析したところ、異なる受容体種による細胞かつ細胞下レベルの発現差異を見出し、ドーパミン機能の多様性を支える受容体発現パターンを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1つの神経伝達物質に対し、機能の異なる複数の受容体種が存在することは、神経伝達物質全般に当てはまり、神経伝達の基本原理のひとつであるが、その機能的意義はよく分かっていない。本研究成果は、ドーパミン応答の多様性を生む分子基盤として、異なる受容体種から成る受容体発現パターンがあることを示すもので、上記の機能的意義に直結する。またドーパミン受容体のアゴニスト、アンタゴニストは、さまざまな精神疾患の処方薬として多く用いられているが、副作用も多い。より安全かつ効果の高い新薬の開発のためにも、ドーパミン受容体の「細胞内効果」の十分な理解が不可欠であり、本成果はその理解につながる分子神経基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：Dopamine plays pivotal roles in diverse cognitive functions ranging from reward and motivation to feeding and sexual behaviors. Differential modulatory effects of dopamine neurotransmission may be defined by distinct expression profiles of functionally different receptor subtypes. We thus conducted systematic expression profiling of four dopamine receptors in the memory center of fruit flies, the mushroom body. By utilizing CRISPR/CAS9 genome editing techniques, we characterized the endogenous receptor gene and protein expressions. We found cellular and subcellular expressions distinct among receptor subtypes, which may characterize their functions as well as the functionality of the mushroom body's subcompartments. Our findings may provide neuroanatomical logic for dopamine neurotransmission causing opposing effects across different subdomains of a brain structure, which supports adaptive behaviors in an animal.

研究分野：神経科学

キーワード：ドーパミン受容体 ショウジョウバエ キノコ体 学習 記憶

1. 研究開始当初の背景

ドーパミンは、報酬や学習など、さまざまな脳機能に重要である。その神経伝達には、複数の受容体種が関わっており、ショウジョウバエにおいても機能の異なる4種の受容体(表1)が知られている。なぜ異なる受容体種を通じたドーパミン神経伝達が必要か、その生物学的意義は十分には理解されていない。

ショウジョウバエは匂いと糖報酬の関係性を学習できる。この嗅覚学習には、キノコ体と呼ばれる脳構造が重要である。糖報酬はドーパミン神経、匂いはキノコ体内在性ケニオン細胞により伝達される。これらの情報は、キノコ体においてケニオン細胞の出力シナプス部で統合される(図1)。キノコ体に投射するドーパミン神経は全20種が同定されており、ケニオン細胞の軸索は、異なるドーパミン神経種の投射によって局所的に働くシナプス群(機能分画)に区分化されている(Aso eLife 2014)。申請者らの成果により、学習において、異なるキノコ体分画へのドーパミン入力は、その機能も異なることが分かってきた(Yamagata PLoS Biol. 2016)。例えば、報酬短期記憶と長期記憶は、異なる分画に投射するドーパミン神経群によって独立に形成されている(Yamagata PNAS 2015; Ichinose eLife 2015)。一方で、糖報酬によって駆動されるキノコ体へのドーパミン入力は、区画を超えて比較的一様である(Liu Nature 2012; Yamagata PNAS 2015)。学習時のキノコ体内の糖効果(つまりドーパミン作用)は、区画ごとに異なるということである。このようなドーパミンの機能多様性は、異なる受容体(表1)によって実現されている可能性が高い。すなわち、キノコ体分画によって受容体の発現パターンが異なり、ドーパミン応答が変化するため、異なるドーパミン効果が生まれると申請者は考えた。この仮説検証のため、キノコ体におけるドーパミン受容体の発現パターンや細胞内局在を可視化し、体系的に比較する必要があった。

	Signal	EC50	Cell line	Reference
DopR1	cAMP	10 ⁻⁶ ~7	Sf9	Sugamori et al., 1995
DopR2	cAMP	10 ⁻⁷	S2	Han et al., 1996
DopEcR	cAMP, Akt	10 ⁻⁸	Sf9	Srivastava et al., 2005
Dop2R	MAPK	10 ⁻⁶ ~7	HEK293	Hearn et al., 2002

表1 ハエのドーパミン受容体 細胞内シグナルの異なる3種のD1様受容体(DopR1, DopR2, DopEcR)とD2様受容体(Dop2R)がある。

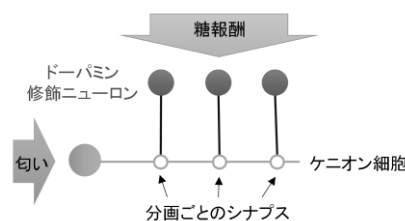


図1 キノコ体の内部構造と学習 ケニオン細胞によって匂い情報が、外来性ドーパミン神経によって糖報酬情報が伝達され、ケニオン細胞上で統合される。個々のケニオン細胞の軸索は、複数のドーパミン神経によって、数珠状に修飾を受ける。

これまででもドーパミン受容体発現細胞の解析は行われてきた。しかし抗体染色による発現解析では、十分なシグナル強度が得られない、受容体の細胞内局在のため発現細胞の全体像を得にくい、脳内にGタンパク質共役型の受容体が多数存在し、他の受容体との交差反応が起きる、といった問題があり、脳構造レベルの受容体構成の解析は難しかった。

2. 研究の目的

キノコ体内のドーパミン受容体マップを構築し、ドーパミン機能の多様性を生む受容体発現様式を理解することを目的とした。そのために以下の二点を当座目標とした。

(1) キノコ体の細胞レベルの受容体構成

後述するドーパミン受容体ノックイン GAL4 系統を用い、キノコ体内の各受容体の発現レベルと共有性を細胞レベルで定量する(図2)。

(2) 受容体の細胞内局在解析とマップ構築

各受容体遺伝子の直後に蛍光タンパクを導入したキメラ受容体を発現する遺伝子改変系統を作製し、ドーパミン受容体のケニオン細胞内の局在を解析する(図2)。①の結果と合わせ、キノコ体内部構造の受容体マップを構築する。

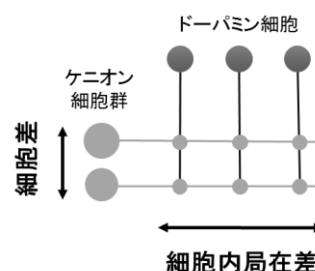


図2 明らかとすべき受容体分布 ケニオン細胞ごとの受容体発現の違いと、細胞内の受容体局在を分画レベルで明らかとする。

3. 研究の方法

(1) キノコ体の細胞レベルの受容体構成

本研究では、近藤周氏(国立遺伝研, Kondo, Genes Genet. Syst., 2014)、谷本拓氏(東北大学)らと共同し、CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集技術により、内在遺伝子の発現パターンを忠実に再現したノックイン GAL4 を作製した。すなわち、標的遺伝子の終止コドン直前に GAL4 トランスジーンをノックインし、内在性タンパク質との融合タンパクとして転写因子 GAL4 を発現

させた。翻訳後に分離するように設計するため、内在遺伝子の発現パターンを妨げることなく GAL4 の発現が可能となった (図 3)。

標的遺伝子の発現細胞を特定するため、GFP による細胞形態観察を実施した。特にキノコ体は、 γ 葉 2 種、 α' β' 葉 3 種、 α β 葉 3 種、計 8 種、約 2000 個のケニオン細胞によって構成され、それぞれの細胞タイプは、葉部の形態観察によって分類可能である。またこれらの細胞体は、キノコ体付近にクラスターとして存在するため、共焦点顕微鏡によって全体を三次元的にスキャンできる。一方、異なるハエ個体間で、単一のケニオン細胞を同定することは困難である。細胞レベルの各受容体種の発現比較のため、2 種の受容体を同一個体の脳で共標識し、検出することにした。これは各受容体種の発現細胞を、異なる遺伝子発現制御システムと抗体染色によって染め分けることで可能となる。そのために必要となる遺伝子発現ドライバー系統は、CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集技術により、適宜作製した。

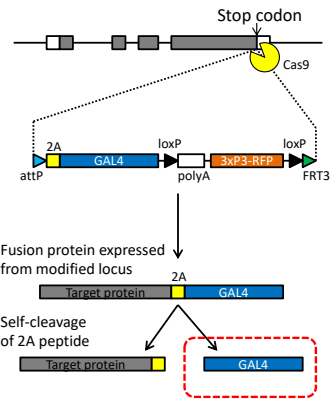


図 3 内在性遺伝子の発現を忠実に反映するノックイン GAL4 システムの原理

(2) 受容体の細胞内局在解析

受容体遺伝子の細胞内局在を明らかにするため、上記と同じ遺伝子ノックイン法を用い、各受容体遺伝子の直後に蛍光マーカーを導入したキメラ受容体を発現するトランスジェニックショウジョウバエ系統を作製した (図 4)。また Split-GFP 技術を応用した細胞種特異的な受容体分子の可視化ツール (下記参照) を作製した。これらのツールを駆使し、キノコ体内における受容体の細胞内局在を形態的に評価した。

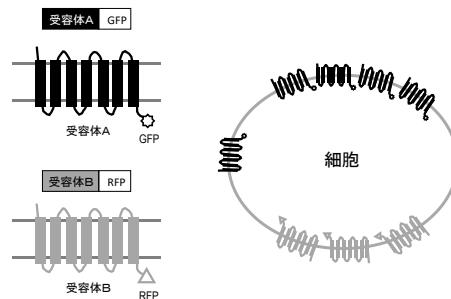


図 4 蛍光タグ受容体と細胞内局在 ドーパミン受容体に直接蛍光タグ付けすることで、細胞内の受容体局在を視覚化できる

4. 研究成果

(1) キノコ体の細胞レベルの受容体構成

作製したツールを用い、各受容体遺伝子を発現するケニオン細胞種を特定した。キノコ体葉部、柄部の観察により、DopR2 を除く受容体種は、すべてのケニオン細胞種に発現することが分かった (図 5)。一方、DopR2 は特に α' β' 葉ケニオン細胞種に局在することが分かった。

次いで、細胞レベルの受容体共発現性を検証した。開発した細胞数自動カウントソフトウェアによる解析では、DopEcR、DopR1、Dop2R ではほぼ同じ数のケニオン細胞が検出された。これらの遺伝子が同じ細胞に発現する可能性が示唆された。このことを実験的に証明するため、受容体種ごとに異なる遺伝子発現制御システムおよびレポーター遺伝子を適用し、さらにキノコ体細胞体部における高解像度イメージングを実施した。その結果、DopEcR、DopR1、Dop2R、どの受容体の組み合わせにおいても、ほぼ完全に発現細胞が一致していた (図 6)。すなわち、単一細胞レベルの受容体の共局在性を明らかにすることができた。

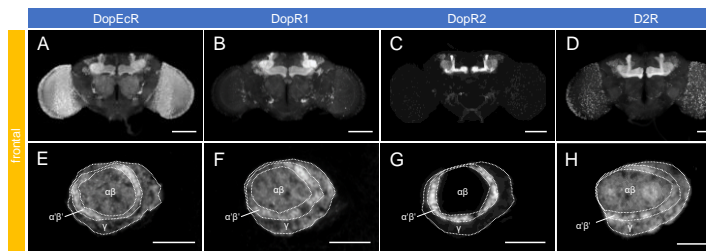


図 5 各ドーパミン受容体遺伝子の脳内 (上) およびキノコ体 (下) 発現パターン

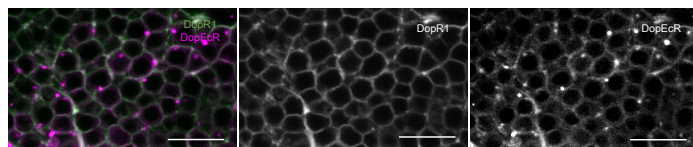


図 6 ケニオン細胞における DopR1 と DopEcR (上)、DopEcR と D2R (下) の共標識

(2) 受容体の細胞内局在解析

作製したツールを用い、ケニオン細胞内の受容体局在を細胞下レベルで観察した。キノコ体葉部、柄部の観察により、DopR1、Dop2R 分子はキノコ体全体に広く分布することが分かった。一方、DopR2 と DopEcR は、キノコ体葉部、柄部にそれぞれ局在することを見出した (図 7)。

ケニオン細胞は、キノコ体全部に一樣に投射する。一方、ドーパミン細胞やキノコ体出力細胞などは、葉部や柄部など、キノコ体の局所に投射する。したがって、DopEcR など、上記で確認された局所的な受容体分布は、必ずしもキノコ体細胞における細胞下レベルの分子分布を意味するものではない。

ケニオン細胞における細胞下レベルの DopEcR 分布を明らかにするため、Split-GFP 技術を応用した細胞種特異的分子可視化ツールを作製した。本技術では、ゲノム編集技術によって DopEcR を GFP11 標識し、GAL4/UAS システムによって細胞種特異的に GFP1-10 を発現させる。これにより、ケニオン細胞内でのみ GFP 会合が生じ、DopEcR 分子が可視化できる。この新たなツールを用いて、DopEcR のケニオン細胞内局在を可視化したところ、キノコ体柄部に特異的に発現が見られ、先の蛍光タグによる観察と同じ発現パターンが確認された。以上により、ショウジョウバエ脳において、ドーパミン受容体の細胞下レベルの受容体局在を明らかにすることに初めて成功した。

以上を受け、キノコ体における細胞下レベルのドーパミン受容体マップを構築した(図8)。キノコ体におけるドーパミン機能は、学習、記憶をはじめ、睡眠、性行動、摂食制御、代謝制御など、実に多岐に渡る。キノコ体において観察された細胞かつ細胞下レベルの受容体発現パターンは、これら多様なドーパミン機能を支える重要な分子神経的基盤になっているものと考えられる。

以上の成果は、Cell Reports 誌に共同第一著者論文として掲載された。

Kondo S*, Takahashi T*, Yamagata N*, et al. Neurochemical Organization of the Drosophila Brain Visualized by Endogenously Tagged Neurotransmitter Receptors. *Cell Rep.* 2020;30(1):284 - 297. e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.018

* co-first authors

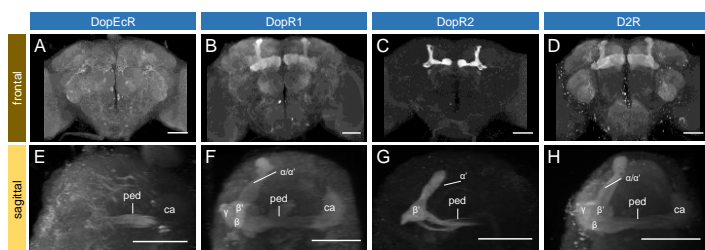


図7 各ドーパミン受容体遺伝子の脳内(上)およびキノコ体(下)発現パターン DopR2 および DopEcR の細胞下レベルの分子局在が明らかとなった。特にキノコ体葉部は、ケニオン細胞の軸索終末が集中する領域であるため、プレシナプス制御における DopR2 機能が示唆された。また DopEcR は、柄部でもより基部に近い部分に局在していた。この領域は、樹状突起が収束し、軸索を形成する遷移領域であり、特に軸索起始部と呼ばれる。当該領域は、イオンチャネルなどが集中し、活動電位の発生部位であるため、DopEcR が活動電位伝搬の制御に重要な役割を担っている可能性は高い。

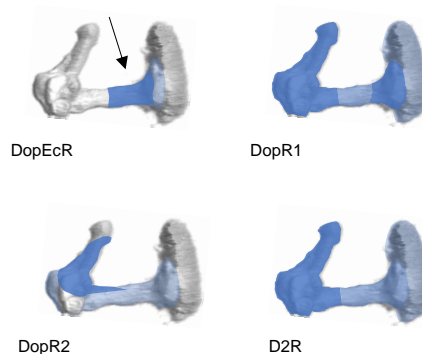


図8 キノコ体における各ドーパミン受容体分子の細胞内局在

4種のうち、DopR1 と D2R はキノコ体全域に発現しているが、DopR2 は葉部に、DopEcR は軸索起始部(矢印)に特に強く発現していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shu Kondo, Takahiro Takahashi, Nobuhiro Yamagata, Yasuhito Imanishi, Hidetaka Katow, Shun Hiramatsu, Katrina Lynn, Ayako Abe, Ajayrama Kumaraswamy, Hiromu Tanimoto	4. 巻 30
2. 論文標題 Neurochemical Organization of the Drosophila Brain Visualized by Endogenously Tagged Neurotransmitter Receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 284-297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Onodera Yuya, Ichikawa Rino, Terao Kanta, Tanimoto Hiromu, Yamagata Nobuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Courtship behavior induced by appetitive olfactory memory	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurogenetics	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1080/01677063.2019.1593978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haenicke Joachim, Yamagata Nobuhiro, Zwaka Hanna, Nawrot Martin, Menzel Randolph	4. 巻 5
2. 論文標題 Neural Correlates of Odor Learning in the Presynaptic Microglomerular Circuitry in the Honeybee Mushroom Body Calyx	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0128-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Toshiharu Ichinose, Hiromu Tanimoto, Nobuhiro Yamagata	4. 巻 11
2. 論文標題 Behavioral modulation by spontaneous activity of dopamine neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in systems neuroscience	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata
2. 発表標題 Neurochemical substrates underlying optimistic cognitive bias
3. 学会等名 2019 Asia-Pacific Drosophila Neuroscience Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata
2. 発表標題 Dopamine receptor system in the associative center of the fly
3. 学会等名 5th NSI International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	近藤 周 (Kondo Shu) (90408401)	国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教 (63801)	
連携研究者	谷本 拓 (Tanimoto Hiromu) (70714955)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	